



Kandidaatintutkielma

Metformiini ja sen vaikutukset

Bence Berki

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyllääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

1. Diabetes ja sen hoito.....	4
2. Metformiinin juuret ja historia	5
3. Farmakokinetiikka	9
4. Farmakodynamiika	10
4.1 AMPK-fosforylaatio	11
4.2 NADH-dehydrogenaasi.....	13
4.3 Metformiinin ja kuparin vuorovaikutus	15
4.4 Glukoosi-6-fosfataasi ja mitokondrionaalinen glyseroli-3-fosfaattidehydrogenaasi	17
4.5 GCN5 ja SIRT1.....	19
4.6 Glukagoni.....	21
5. Yhteenveto.....	22
6. Kirjallisuusviitteet	24

Käytetyt lyhenteet

ACC	Asetyylikoentsyymi-A-karboksylaasi (Acetyl-CoA carboxylase)
AMPK	Adenosiini monofosfaatti-aktivoitu proteiinikinaasi (AMP-activated protein kinase)
CaMKK β	Ca ²⁺ /kalmoduliiniriippuvainen proteiinikinaasi- β (Ca ²⁺ /calmodulindependent proteinkinase – β)
CBS	Kystationibetasyntaasi (Cystathionine- β -synthase)
ChREBP	Hiilihydraattireaktioon vastaava elementtiliittäjäproteiini (Carbohydrate-response element-binding protein)
GCN5	Histoniasetyylitransferaasi (Histone acetyltransferase)
LADA	Piilevä autoimmuuni diabetes aikuisilla (Latent autoimmune diabetes in adults)
LKB1	Maksakinaasi B1 (Liverkinase B1)
MATE	Lääkeaineita ja toksiineja siirtävä kuljetusproteiini (Multidrug and toxin extrusion transporter)
mGPDH	mitokondrionaalinen Glyseroli-3-fosfaattidehydrogenaasi (mitochondrial Glycerol-3-phosphate dehydrogenase)
MODY	Nuorilla alkava perinnöllinen diabetes (Maturity-onset diabetes in the young)
OCT	Orgaaninen kationi transportteri (Organic cation transporter)
PEPCK	Fosfoenolipyruvaattikinaasi (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PGC1- α	Peroksisomiproliferaattori-aktivoitukoaktivaattori-1-alfa (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)
PMAT	Plasmamembraanimonoamiinitransportteri (Plasma membrane monoamine transporter)
RC1	NADH-dehydrogenaasi (Respiratory complex I)
SITR1	NAD-riippuvainen proteiinideasetylaasisitruini-1 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1)
SREBP1	Sterolisäätelijäelementinliittäjäproteiini 1 (Sterol regulatory element-binding protein 1)

1. Diabetes ja sen hoito

Diabetes viittaa joukkoon sairauksia, joissa plasman kohonnut glukoosipitoisuus eli verensokeri on keskeisessä roolissa. Kohonnut verensokeri aiheutuu yleensä haiman huonosta insuliinin tuotannosta ja elimistön heikentyneestä insuliinivasteesta tai molempien samanaikaisesta vaikutuksesta (THL 2020). Diabetes aiheuttaa erinäisiä komplikaatioita, jotka voivat olla lyhyt- tai pitkävaikutteisia. Näitä ovat esimerkiksi verensokeritasojen vaihtelut, ketoasidoosi eli elimistön happomyrkytys, hermosto- ja munuaissairaudet sekä diabeettinen silmätauti. Kohonnut verensokeri vahingoittaa myös verisuonia ja kasvattaa riskiä sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin (Terveyskirjasto 2018).

Diabetesta sairastaa maailmanlaajuisesti 422 miljoonaa ihmistä (WHO 2020). Yli 30-vuotiaista suomalaisista arviolta 429000 henkilöllä on diabetes. Näistä potilaista noin 10-15 % sairastaa tyypin 1 diabetesta ja arviolta 65-75 % tyypin 2 diabetesta. (Lindström *et al.* 2017). Muita diabeteksen ilmenemismuotoja ovat LADA (10-15 %), MODY (5 %), sekä raskausdiabetes, joiden ilmeneminen on huomattavasti kahta ensimmäistä diabeteksen muotoa harvinaisempaa. (Terveyskirjasto 2018)

Diabetesta hoidetaan taudinkuvan mukaan lääkehoidoilla sekä elämäntapamuutoksilla, joiden tarkoituksena on saada plasman glukoosipitoisuus matalammaksi. Tyypin 1 diabeteksen hoidossa käytetään ensisijaisesti insuliinilääkkeitä, koska taudinkuvaan kuuluu haiman β -solujen tuhoutuminen, minkä takia elimistö ei kykene tuottamaan itse tarvitsemaansa insuliinia (THL 2020, Terveyskirjasto 2018)

Tyypin 2 diabeteksessa insuliinin tuotanto elimistössä on tavallista heikompaa ja soluille on kehittynyt ns. insuliiniresistenssi, joka estää glukoosin kunnollisen absorption kohdesoluihin. Tyypin 2 diabeteksen hoidossa ensisijaisin ja yleisin hoidossa käytetty lääkeaine on metformiini. (Duodecim käypähoito 2016, Colagiuri *et al.* 2012)

Tämä tutkielma perehtyy tarkemmin metformiinin monivaiheiseen historiaan, sen solutason ominaisuuksiin ja vaikutusmekanismeihin tyypin 2 diabeteksessa.

2. Metformiinin juuret ja historia

Metformiini eli N,N-dimetyylibiguanidi ($C_4H_{11}N_5$) on biguanidiineihin kuuluva yhdiste, joka on jalostettu guanidiinista, jota esiintyy runsaasti mm. rohtovuohenherneessä (*Galega officinalis*). Metformiinin CAS-numero on 657-24-9 ja sen moolimassa on 129,1659 g/mol (Bailey & Day 2004, Pubchem 2020). Guanidiini (CH_5N_3) on puolestaan vahva emäs, jonka CAS-numero on 113-00-8 ja moolimassa 59.07 g/mol (Pubchem 2020, Günther *et al.* 2006).

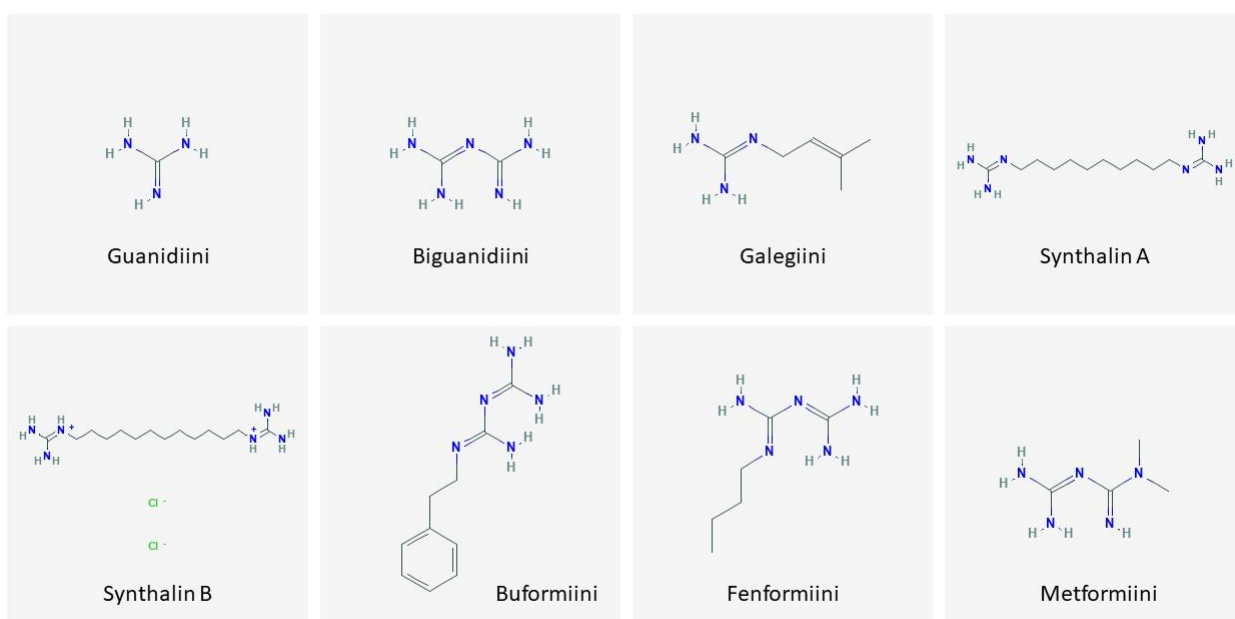
Guanidiini löydettiin vuonna 1861, Adolph Streckerin tutkiessa perulaisesta guanosta eristetyn guaniinin oksidatiivista hajoamista. Guanidiinia valmistetaan pääosin ammoniumsuoloista ja disyanidiamdeista. Kaksivaiheisessa reaktiossa syntyy välituotteena biguanidiinia, joka käsitellään uudelleen ammoniumsuolalla, josta muodostuu guanidiinisuoloja. Guanidiinia käytetään paljon kemian teollisuudessa muovien, tekstiilien, maatalouskemikaalien ja lääkeaineiden valmistamiseen. Guanidiinia esiintyy myös nisäkkäiden virtsassa ja sitä syntyy mm. arginiinin ja kreatiinin hajoamistuotteena (Reiter & Horner 1978, Günther *et al.* 2006).

Rohtovuohenhernettä pidetään kuitenkin lääketieteellisesti lähtökohtana metformiinin kehitykselle, sillä rohtoa on käytetty varhaisessa lääketieteessä jo 1600-luvulla erilaisiin vaivoihin, kuten kuumeeseen, epilepsiaan, matojen karkottamiseen sekä ruttoon (Culpeper 1995 & Bailey 2017).

Kiinnostus rohtoa kohtaan lisääntyi etenkin 1920-luvulla, kun ensimmäiset havainnot guanidiinin lääkeainepotentialista diabetekseen liittyen tehtiin (Bailey 2017). Ensimmäinen merkittävä tulos oli C. K. Watanaben, tutkimuksessa huomattu guanidiinin hypoglykemiaa aiheuttava vaikutus eläinsoluissa. Aikaisempien tutkimusten mukaan kilpirauhasen poistaminen aiheuttaa guanidiinin ja metyyliguanidiinin tasojen nousun eläinsoluissa, joka aiheuttaa lihaskouristelua sekä lisääntynyttä guanidiinin erittämistä virtsassa. Watanabe suoritti kokeita kaneilla altistamalla nämä guanidiinihydrokloridille ja seuraamalla, kuinka tämä vaikuttaa eläinten sokerimetaboliaan. Lopputuloksena altistetuilla kaneilla oli huomattavasti matalammat verensokeritasot kuin kontrolli kaneilla, josta tehtiin päätelmä, että guanidiini toimii verensokeria laskevana aineena (Watanabe 1918).

Guanidiinin verensokeria laskevasta vaikutuksesta huolimatta, se on varsin myrkyllinen yhdiste. Esimerkiksi guanidiinihydrokloridin letaali annos on 475 mg/kg ja sen haitallisia sivuvaikutuksia ovat pahoinvointi, oksentelu, luuytimen ja munuaisen vajaatoiminta, anemia, hermoston yliherkkyys, lihaskouristukset sekä verenkierron häiriöt (Drugbank 2020).

Lääkekehitys suuntautui enemmän erilaisten biguanidiini-johdannaisten tutkimiseen, joilla todettiin olevan guanidin kaltaisia verensokeria alentavia ominaisuuksia eläinsoluissa ja huomattavasti matalampi toksisuus (Bailey 2017, Rea *et al.* 2018). Tällaisia aineita olivat esimerkiksi galegiini, sekä pitkän hiiliketjun omaavat Synthalin A ja B (Kuva 1), jotka toimivat vähemmän myrkyllisinä biguanidiini variantteina. Kuitenkin insuliinin löytyminen vuonna 1921, oli ratkaiseva läpimurto diabeteksen hoidossa, mikä vaikutti suuresti guanidiinilääkkeiden tutkimuksen vähenemiseen 1930-1940-luvuilla (Bailey 2017).



Kuva 1. Guanidiini ja sen eri johdosten molekyylien rakennekaavat (Pubchem 2020)

Eräänä palasena metformiinin historiassa voidaan pitää guanidiinipohjaisten proguaniilin ja ”flumamiinin” löytymistä 1940-luvulla malarialääketutkimuksen yhteydessä. Proguaniilin väitettiin laskevan eläinsoluissa veren glukoosi tasoa guaniinin tavoin (Curd *et al.* 1945). Myös filippiiniläisen lääkärin Eusebio Garcian uskotaan olevan myös osana metformiinin historiaa, sillä metformiinin varsinainen löytäjä ja patentoiija, ranskalainen lääkäri Jean Sterne on viitannut Garcian ”dokumentoimattomaan tutkimukseen” antamassaan haastattelussa vuonna 1996 (Bailey 2017, Rea & Tien 2018)

Oletetusti, Garcia tutki 1940-luvun lopussa Filippiinien malariaepidemian aikaan N1-dimetyyliaminoguanidyylibiguanidiinihydrokloridia yhtäaikaaisesti malaria, sekä influenssalääkkeenä. Garcia nimesi lääkkeen ”flumamiiniksi”, mutta tietämättään hän oli löytänyt

nykyään metfomiinina tuntemamme yhdisteen. Lähteet eivät spesifioi, miten Garcia oli onnistunut valmistamaan ”flumamiinia”, mutta nykyään uskotaan hänen käyttäneen Wernerin ja Bellin 1922 vuodelta peräisin olevaa julkaisua, jossa syntyi metyyliguanidiinia ja $\beta\beta$ -dimetyyliguanidiinia (Bailey 2017, Werner & Bell 1922). Garcian mukaan flumamiinilla oli influenssaa parantavia vaikutuksia testattujen malariapotilaiden joukossa ja hän spekuloi flumamiinilla olevan myös verensokeria alentavia vaikutuksia, perustuen molekyylin rakenteellisiin yhtäläisyyksiin muiden biguanidijohdosten kanssa. Tätä hän ei kuitenkaan pystynyt todistamaan tieteellisesti, koska yhdeltäkään flumamiinia nauttineelta potilaalta ei mitattu verensokeriarvoja (Garcia 1949, Rea *et al.* 2018).

Jean Sterne kuitenkin väitti lukeneensa Garcian *Journal of the Philippine Medical Association* –lehdessä julkaiseman tutkimuksen flumamiinista, joka inspiroi häntä tekemään omaa tutkimusta biguanideista 1950-luvulla (Pasik 1997). Sternellä oli jo ennestään taustaa epäonnistuneesta tutkimuksesta galegiinin liittyen yhdessä professori Francis Ratheryn kanssa (Bailey 2017). Vuonna 1956 Sterne teki tutkimusta biguanidiinien farmakodynamiikasta yhdessä farmaseutti Denise Duvalin kanssa hyödyntäen terveitä ja diabeettisiä koe-eläinmalleja. Tutkimuksessa ilmeni kuitenkin ennestään tutut guanidiinipohjaisten molekyylien haitat, mutta Sterne valitsikin metformiinin jatkotutkimuksiin, sillä se ilmensi vähiten haittoja koe-eläimillä (Bailey 2017).

Sterne haki metformiinille lopulta patenttia vuonna 1957 julkaisullaan, jossa hän kuvaili metformiinia ”glukofaagiksi eli sokerin syöjäksi”, joka toimi pitkään metformiinin kaupallisena nimenä 2000-luvulle saakka. Julkaisua pidetään nykyään virallisena lähtölaukauksena metformiinille diabeteksen hoidon saralla (Rea & Tien 2018, Bailey 2017).

Metformiinin rinnalle kehitettiin myös kaksi muuta biguanidiinivalmistetta, fenformiini (Ungar *et al.* 1957) ja buformiini, joiden käyttö yleistyi etenkin MODY-diabeteksen hoidossa sekä sulfonyyliureoiden korvaavana lääkkeenä. Kuitenkin 1970-luvulla huomattiin maitohappoasidoosi tapausten kasvu etenkin fenformiinin käyttäjillä (Luft *et al.* 1978), joka johti fenformiinin takaisinvetoon markkinoilta aluksi 1978 ja buformiinin valmistus lopetettiin Euroopassa pari vuotta myöhemmin (Nattras M 1978, Bailey 2017).

Metformiinin maineeseen vaikutti negatiivisesti myös löydös 1980-luvulta, jossa ilmeni, että euroopan väestöstä, jopa 9 %:lla on geenimutaatio CYP2D6-geenissä, joka koodaa sytokromi CYP2D6-hydroksylaasi entsyymiä, jonka seurauksena fenformiinin kaltaiset lääkeaineet kertyvät elimistöön ja aiheuttavat osalla diabetespotilailla maitohappoasidoosin (Shah *et al.* 1980, Bosisio *et al.* 1980).

Vasta 1990-luvulla metformiini hyväksyttiin USA:ssa, jonka jälkeen julkistettiin Isossa-Britanniassa tehty pitkän linjan diabetestutkimus (1977-1997), joka lopulta johti metformiinin yleiseen ja maailmanlaajuiseen hyväksyntään. Tutkimus todisti, että ylipainoiset metformiinia käyttäneet tyypin 2 diabetespotilaat elivät pitempään ja kärsivät vähemmän sydän- verisuonisairauksista, kuin vastaavasti insuliinilla tai muulla lääkityksellä hoidetut potilaat (UKPDS 1998).

3. Farmakokinetiikka

Metformiinia käytetään yleisesti suun kautta annosteltavana lääkkeenä, käytännössä metformiinihydrokloridina ($C_4H_{12}ClN_5$), jonka suositeltu aloitusannosmäärä on aikuisella 500 mg 2-3 kertaa päivässä. Metformiinin happovakio on 11,5 ja molekyylin luonteen takia, sen passiivinen imeytyminen solukalvon läpi on lähes olematonta, mutta hydrofobinen metformiini voi toimia substraattina erilaisille orgaanisille kationi transporttereille (OCT). Metformiini esiintyy fysiologisessa pH:ssa kationimuodossaan (Pharma Fennicia 2016, Graham *et al.* 2011).

Imeytyminen tapahtuu ohutsuolesta, jossa metformiini kulkeutuu aktiivisesti enterosyyttien pintakerroksessa sijaitsevan PMAT-kuljetusproteiinin kautta lumenista ohutsuolen epiteelikudokseen. PMAT toimii ensisijaisena reittinä metformiinille, mutta myös kuljetusproteiineilla OCT1, OCT2 ja OTC3 on huomattu olevan aktiivista vuorovaikutusta metformiinia kohtaan. Tarkennettuna OTC1:n on havaittu siirtävän metformiinia enterosyyteistä verenkiertoon, sekä verenkierrosta hepatosyytteihin. OTC3 voi myös kuljettaa metformiinia ohutsuolen lumenista, mutta OTC3-kuljettajien lukumäärä on huomattavasti pienempi verrattuna PMAT-kuljettajiin. OTC3 esiintyy myös OTC1:n tavoin hepatosyyttien pinnalla. OTC2-proteiini kuljettaa metformiinia verenkierrosta munuaistiehyitten epiteeliin (Zhou *et al.* 2007).

Oraalisesti nautitun lääkeaineen suhteellinen hyötyosuus vaihtelee 50-60 % välillä. Lääkeaineen huippukonsentraatio on 1,5 $\mu\text{g/ml}$ 1500 mg annoksessa, joka saavutetaan 4-5 tunnin kuluttua lääkkeen annostelusta. Metformiinin jakautuminen kehossa on melko tasaista, mutta suurimpia lääkeainepitoisuuksia on havaittu maksassa, munuaisissa, ohutsuolen epiteelisoluissa ja sylkirauhasissa, kun taas vähemmissä määrin keuhkoissa, lihaksissa ja pernassa (Pharma Fennicia 2016, Graham *et al.* 2011).

Edellä mainittujen kuljetusproteiinien lisäksi myös MATE1 ja MATE2K transporttereilla on osuutensa metformiinin jakautumisessa ja eliminaatiossa. Näiden proteiinien tehtävänä on siirtää metformiinia munuaistiehyen epiteelistä luumenin sisään, josta se sitten eliminoituu virtsan joukkoon (Tanihara *et al.* 2007). Metformiini ei metaboloitu, eikä juurikaan sitoudu plasman proteiineihin. Terminaalinen puoliintumisaika metformiinille on noin 5-6 tuntia riippuen potilaan terveydentilasta. Ne diabeetikot joilla on lievää munuaisen vajaatoimintaa, eliminaatio kestää pitempään. Korkeammat lääkeainepitoisuudet munuaiskudoksessa, johtuvat todennäköisesti metformiinin tavasta eliminoitua, eivätkä niinkään lääkeaineen vaikutuksesta munuaiskudoksessa (Pharma Fennicia 2016, Graham *et al.* 2011).

4. Farmakodynamiikka

Metformiinin tärkein tarkoitus on laskea elimistön glukoosi tasoja, sekä parantaa solujen insuliinivastetta, mutta mekanismi jolla tämä saavutetaan, on ollut jo kauan kiistelty ja epäselvä. Ensisijaisesti metformiinin on huomattu laskevan glukoosin tuotantoa maksassa, mutta viimeaikaisten tutkimusten mukaan myös suolistolla on havaittu olevan entistä suurempi rooli metformiinin vaikutusmekanismeissa (Rena *et al.* 2017).

OCT1-kuljetusporteini on todistetuksi ensimmäinen reseptori metformiinin hepatosyyttisellä reitillä. Yan Shun tutkimuksessa 2007 ilmeni, että OCT1:n mutaatiot ja funktionaalisuus vikuttavat suuresti metformiinin toimintaan. Koeyksilöinä käytettiin hiiriä, joilla oli joko toimiva OCT1 kompleksi, mutatoitunut variaatio OCT1:stä tai kokonaan eliminoitu OCT1 reseptori. Kokeessa huomattiin, että yksilöillä joiden OCT1-proteiinit olivat mutatoituneet tai kokonaan poistettu, metformiini vaikutti heikommin hepatosyytin AMPK-fosforylaatioon ja glukoneogeneesiin. Etenkin geenimutaatio OCT1-420del, jonka alleelifrekvenssi valkoisessa amerikkalaisväestössä on 20 %, näytti reagoivan huonommin metformiiniin aiheuttamaan vasteeseen (Shu *et al.* 2007).

Metformiinilla on havaittu ainakin kolme merkittävää vaikutusreittiä maksasoluissa, joita ovat metformiinin indusoima AMPK-fosforylaatio, mitokondrion hengitysketjun kompleksi I:n (RC1) inhibitio sekä mitokondrionaalisen glyseroli-3-fosfaattidehydrogenaasin (GPDH) inhibitio (He & Wondisford 2015).

Edellä mainittujen lisäksi metformiinilla on havaittu olevan myös vuorovaikutusta histoniasetyylitransferaasiin (GCN5), sitruiniiniin (SITR1) sekä inhiboiva vaikutus glukagonin toimintaan (Caton *et al.* 2010, Miller *et al.* 2013).

4.1 AMPK-fosforylaatio

Adenosiini monofosfaatti-aktivoitu proteiinikinaasi eli AMPK on heteromeerinen proteiini, joka koostuu kolmesta osasta; aktiivisesta α -yksiköstä (63 kDa), alayksiköistä β (40 kDa) ja γ (38 kDa). AMPK kuuluu hiivojen SNF1-proteiinikinaasien alaheimoon ja sillä on tärkeä rooli elimistön energiametaboliassa, ja se säätelee monia metabolisia reittejä, kuten rasvahappojen oksidaatiota ja synteesiä, glykolyysiä sekä glukoneogeneesiä (Stapleton *et al.* 1996, Carling *et al.* 2008). AMPK toimii ns. energiamonitorina, joka reagoi solun kärsiessä energiavajeesta inhiboimalla adenosiinitrifosfaattia (ATP) kuluttavia metaboliareittejä ja aktivoimalla ATP:a syntetisoivia prosesseja. AMPK:n aktivaatio tapahtuu joko maksakinaasi B1:n (LKB1) tai Ca^{2+} /kalmoduliiniriippuvaisen proteiinikinaasi- β :n (CaMKK β) johdosta. Normaalisti LKB1 toimii kasvunsäätelijänä solussa, joka reagoi ympäristön ravintoainepitoisuuksiin ja niiden muutoksiin. Se koostuu kahdesta alayksiköstä STRAD ja MO25 liittäjäproteiineista, jotka osallistuvat AMPK:n aktivaatioon. CaMKK β toimii taas kalsium-riippuvaisen reaktioreitin säätelijänä AMPK:lle (Carling *et al.* 2008).

Solun kärsiessä energiavajeesta tilanteeseen liittyy usein ravintoaineiden puute. ATP:a kulutetaan metaboliassa, joka johtaa solun sisäisen adenosiinimonofosfaatin (AMP) pitoisuuden kasvuun. AMP-molekyylit reagoivat AMPK:n kanssa liittymällä suoraan AMPK:n γ -alayksikön kystationibetasyntaasi (CBS) domeeneihin, jotka puolestaan aikaansaavat α -yksikön aktiiviseen kohtaan konformaation muutoksen. Ylemmät säätelijäkinaasit LKB1 ja CaMKK β liittyä aktiiviseen kohtaan, ja aktivoivat AMPK:n fosforyloimalla α -yksikön aminohappotähteen treoniini 172 (Shaw *et al.* 2005).

Fyysisen rasituksen aikana AMPK:n aktivaatio inhiboi asetyylikoentsyymi-A-karboksyylaasia (ACC) sekä vähentää muiden lipolyyttisten entsyymien geeniekspressiota. Tämä lisää ATP:n tuotantoa rasvahappojen oksidaation kautta, tuottamalla 6-8 molekyylia ATP:a rasvahappoa kohden. AMPK:n aktivaation on huomattu myös lisäävän glukoosin sisäänottoa luustolihaksissa ja todistettu sen olevan osana glukoosin metaboliareittiä ja näin myös osana metformiinin terapeuttista vaikutusta (Hayashin *et al.* 1998, Hardie *et al.* 1997).

Hepatosyyteissä metformiinin on todettu vaikuttavan AMPK:n aktivaatioon. Zhou *et al.* 2001 tehdyssä tutkimuksessa kokeessa käytetyille rotille annettiin metformiinia ja seurattiin, kuinka se tehoaa AMPK:n aktivointiin. Kokeesta selvisi, että metformiinilla käsitellyille rotille hepatosyyttien sisäinen metofrmiinikonsentraatio oli huomattavasti isompi, kuin veriplasman konsentraatio. Kokeessa vertailtiin ihmisen ja rotan hepatosyyttejä, joissa 500 μM metformiini annos aktivoi

AMPK:ta huomattavasti jo yhden tunnin sisällä. Silti 50 μ M annos seitsämän tunnin aikana riitti vasteen saavuttamisen AMPK:n aktivoinnissa. Metformiinin aiheuttaman AMPK:n aktivoimisen katsottiin olevan ajasta ja konsentraatiosta riippuva reaktio (Zhou *et al.* 2001).

Kyseisessä tutkimuksessa huomattiin myös AMPK:n aktivoinnin vaikuttavan myös transkriptiotekijöiden ekspressointiin. Sterolisäätelijäelementinliittäjäproteiini (SREBP1) on insuliinin stimuloima transkriptiotekijä, jonka viallinen toiminta on kytköksissä insuliiniresistenssiin, dyslipidemiaan ja tyypin 2 diabetekseen. SREBP-1 säätelee mm. lipogeenisten entsyymien, kuten rasvahapposyntaasin (FAS), SREBP-1:n (S14) sekä L-tyypin pyruvaattikinaasin (L-PK) geeniekspressiota. Zhoun kokeissa metformiini hillitsi vahvasti SREBP-1:n ekspressiota, mikä näkyi lipogeenisten entsyymien ja niiden proteiinisynteesiin tarvittavan l-RNA:n määrän laskuna. Kokeita suoritettiin myös AMPK-inhibiittoreilla, kuten dorsomorfiinilla ($C_{24}H_{25}N_5O$ ns. Compound C) yhdessä metformiinin kanssa, joista huomattiin, että hepatosyyttinen glukoosin tuotanto ei vähentynyt inhibiittorin läsnäollessa (Zhou *et al.* 2001). Edellä aiemmin viitatussa tutkimuksessa selvitettiin LKB1:n vaikutusta glukoosi tasapainoon hiirillä. Kokeessa testattiin LKB1:n menettämistä ja sen vaikutusta AMPK:n fosforylaatioon, glukoneogeneesiin sekä metformiinin toimintaan (Shaw *et al.* 2005).

LKB1:n puttuessa TORC2-koaktivaattori defosforyloi cAMP-vasteenelementinsitojaproteiinia (CREB), mikä johtaa glukoneogeneesin aktivointiin peroksisomiproliferaattori-aktivoitunkoaktivaattori-1-alfaa (PGC1- α) koodaavan *PPARGC1A*-geenin kautta. Kyseinen geeni on tärkeä glukoosiaineenvaihdunnalle, koska ilman sitä koekysilöillä ilmeni voimakasta hypoglykemiaa ja kasvanutta glukoosi-6-fosfataasin (G6PT) sekä fosfofenolipyruvaattikarboksylaasin (PEPCK) l-RNA:n ekspressiota. PGC-1- α -proteiinin pitoisuus oli suhteellisen korkea myös paastoavilla hiirillä, joilla ei ollut hepaattista LKB1:ta (Shaw *et al.* 2005).

Hiirillä joilta puuttui LKB1, AMPK:n aktivoiminen heikkeni lähes olemattomaksi. Reaktioreittiin osallistuvaa TORC2-koaktivaattorin toimintaa tutkittiin myös adenoviruksen ”pienen hiuspinni-RNA:n” avulla, joka vähensi merkittävästi myös TORC2-koaktivaattorin ekspressiota. Tämä tarkoittanee TORC2:n olevan merkittävä osa glukoneogeneesin reaktioreittiä ja sen säätelyä. Metformiini ei puolestaan aikaansaanut hiirien maksasolujen glukoosi tasojen laskua yksilöissä, joilta LKB1 oli poistettu, mikä viittaa siihen, että sekä LKB1:n että AMPK:n aktivoiminen ovat olennainen osa metformiinin toimintaa (Shaw *et al.* 2005).

4.2 NADH-dehydrogenaasi

Kuten edellä todettiin, AMPK:n fosforylaatio sekä LKB1:n aktivaatio ovat tärkeitä askeleita metformiinin toiminnassa, mutta biguanidi ei vaikuta kyseisiin entsyymeihin suoraan. Esimerkiksi Zhoun *et al.* 2001 tutkimus ehdottaa vaikutusmekanismeiksi joko AMPK-kinaasin (AMPKK) aktivoimista AMPK:n fosforyloimiseksi tai suoraa liittymistä AMPK:n paremman entsyymisubstraatti vuorovaikutuksen luomiseksi AMPKK:lle. Metformiinin liittyminen AMPK:iin spekuloidiin myös huonontavan proteiinifosfataasien defosforylaatiokykyä, mikä heikentäisi AMPK:n aktiivisuutta. Hypoteesi metformiinin ja AMPK:n suorasta allosteerisestä aktivaatiosta poissuljettiin, kun aineet eivät reagoineet keskenään toisin kuin AMP ja AMPK (Hawley *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2001).

Owen *et al.* 2000 ja El-Mir *et al.* 2000 esittävät metformiinin vaikuttavan hepatosyyttien mitokondrioissa toimivaan NADH-dehydrogenaasiin eli hengityskompleksi I:een (RC1). Syitä tälle ovat aikaisemmat löydökset guanidiinijohdannaisien kyvystä inhiboida mitokondrion energiantuotantoa elektroninsiirtoketjussa (Schäfer & Bojanowski 1972), sekä näyttö glukoneogeneesin inhiboimisesta vaikuttamalla elektroninsiirtoketjuun 3,4-dikloorifenyyli-1,1-dimetyyliurealla muuttamatta solun ATP:n kokonaiskonsentraatiota (Owen *et al.* 1993).

Owenin tutkimuksessa rotan hepatoomasoluja käsiteltiin metformiinilla 50 and 100 μ annoksilla 24 ja 60 tunnin ajan. Tämä johti sitruunahappokiertoos osallistuvien malaatin ja glutamaatin oksidaation huomattavaan vähenemiseen, mikä viittaa hengitysketjun inhibitiioon. Sukkinaatin oksidaatiota kyseisissä koe-olosuhteissa ei havaittu, mikä viestii spesifistä inhibitiosta, joka ei koske hengitysketjun kaikkia komplekseja. RC1:n osalta vastaavaa inhibitiota havaittiin eristetyssä mitokondrioissa, mutta vain suuren (79 mM) metformiinipitoisuuden vallitessa (Owen *et al.* 2000). RC1:n inhibitiota tukee myös El-Mir *et al.* 2000 suorittama koe, missä RC1:n erottaminen hengitysketjusta desyyliubikinonilla ja käsittely metformiinilla vähensi elektronien siirtoa huomattavasti, verrattuna kompleksiin jota ei oltu käsitelty metformiinilla. Lisäksi testattaessa samaa hengitysketjun kompleksilla III, eroa näytteiden välillä ei ollut mitattavissa (El-Mir *et al.* 2000).

Kuitenkin, metformiinin vaikutus RC1:een on osoitettu olevan pikemminkin osittain selektiivistä, kuin täysin spesifistä. Cameron *et al.* 2017 todisti, että fenformiini ja joukko muita verensokeria laskevia bi- ja diguanidimolekyylejä olivat moninkertaisesti metformiinia tehokkaampia vaikuttamaan hepatosyyttien glukoosimetaboliaan. Metformiini ja verrattavat molekyylit kykenivät inhiboimaan solun hapenkulutusta tietyillä eroavaisuuksilla (Cameron *et al.* 2017).

Kokeessa käsiteltiin hiirten hepatosyyttejä sekä H4IIE-hepatooma soluja, joita käsiteltiin DMEM-kasvatusliuoksessa, jonka jälkeen niistä mitattiin glukoosiarvot heksokinaasi-glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasi menetelmällä. Soluista eristettiin myös mitokondrioita, joita käsiteltiin metformiinilla sekä diguanideilla hydrofobisen elektronivastanottajan (ubikinoni) läsnäollessa ja niistä valmistettiin submitokondrionaalisia partikkeleita (SMP). Tällä menetelmällä päästiin käsiksi hengitysketjun entsyymikomplekseihin, kääntämällä mitokondrion sisäkalvo ympäri. Tutkimus hyödynsi WST-1 menetelmää, missä mitattiin kunkin bi- ja diguanidin dehydrogenaasiaktiivisuutta ja vertailtiin sitä kunkin molekyylin hydrofobisuuteen (Chameron *et al.* 2017). Lukuun ottamatta metformiinia, muut guanidiinijohdannaiset inhiboivat NADH:n oksidaatiota etenkin SMP:ssä. Ehjissä mitokondrioissa diguanidi DG8 aiheutti suurinta NADH/NAD⁺ pelkistystä, joka johti lopulta mitokondrion toiminnan lakkaamiseen hapen lopputtua. Metformiini puolestaan heikensi mitokondrion hapenkulutusta, mutta hapetti lievästi NADH/NAD⁺. Toisin kuin DG8:lla, metformiini ei aiheuttanut mitokondrion totaalista toimimattomuutta hapen lopputtua (Chameron *et al.* 2017). Metformiinin osittaista RC1 inhibitiota perustellaan sillä, että muitten guanidien inhibitio oli paljon suurempaa pienemmissä pitoisuuksissa. Molekyylin muoto ja hydrofobisuus näyttivät vaikuttavan inhibition tehokkuuteen positiivisesti. Haaroittuneilla diguanideilla, joiden hiilivedystä koostuva sivuketju oli alle viiden hiilen mittainen, ei havaittu lainkaan glukoosimetaboliaan vaikuttavia ominaisuuksia (Chameron *et al.* 2017).

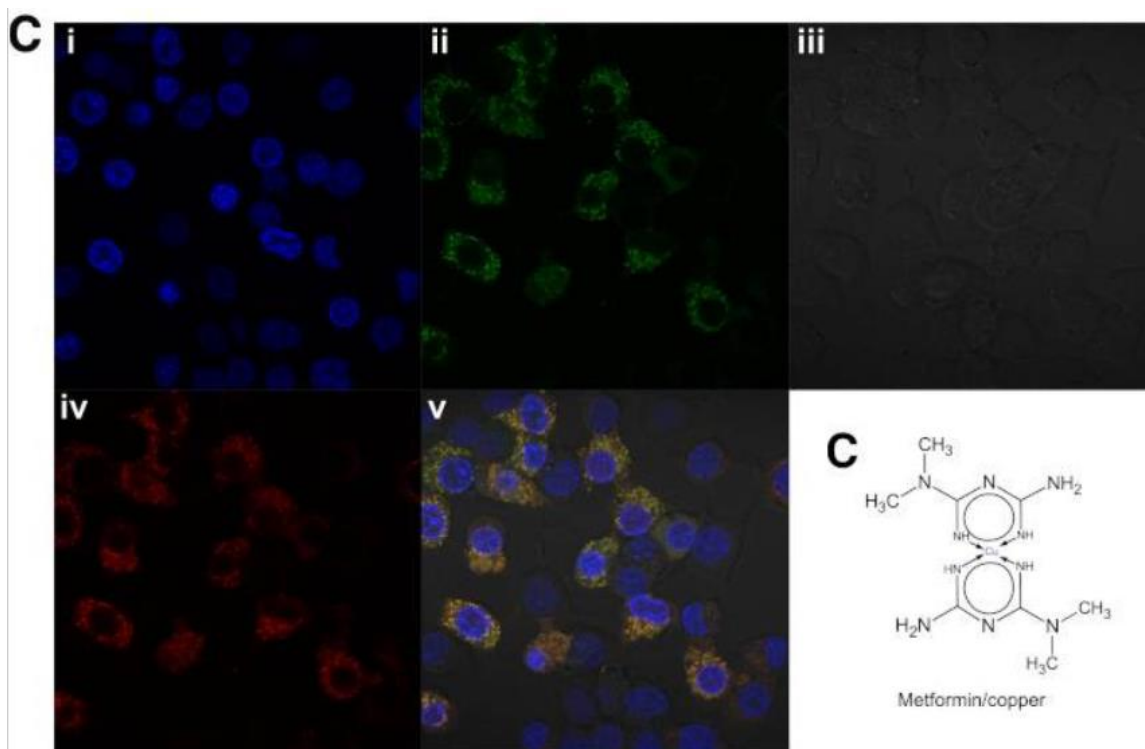
Tulokset viittaavat siihen, että metformiini tarvitsee aktiivisia mitokondrioita päästäkseen vaikuttamaan kunnolla mitokondrion dehydrogenaasiaktiivisuuteen. Tutkittaessa SMP:itä mikrolevyillä, metformiinin vaikutus oli huomattavasti muita guanideja heikompi ja se hävisi vertailuarvoissa diguanidille, joka oli metformiiniakin hydrofiilisempi. (Chameron *et al.* 2017) Koska RC1 tarvitsee NADH:ta toimiakseen, NADH:n puuttuessa RC1:n ikään kuin ”deaktivoituu”. Kokeessa huomattiin, että SMP:ssä metformiinilla ja diguanideilla oli eroja dehydrogenaasiaktiivisuuden inhiboimisessa. Esimerkiksi DG5 inhiboi nopeasti, toisin kuin metformiini, joka tarvitsi enemmän aikaa vastaavan inhibition saavuttamiseen isommilla pitoisuuksilla. Tämä voi viitata siihen, että bi- ja diguanideilla on erilainen affiniteetti RC1:ä kohtaan riippuen onko ympäristössä NADH:ta vai ei (Chameron *et al.* 2017).

Verrattaessa korkeita metformiinipitoisuuksia (0,2 mM ja 0,5 mM) huomattiin, että korkeampi pitoisuus inhiboi glukoosin hapetusta, kun taas matala pitoisuus ei aiheuttanut reaktiota. Isot metformiinipitoisuudet lisäävät NADH:n ja NAD:n pelkistystä viitaten RC1:n inhibitioon. Pienemmät pitoisuudet taas lisäävät näitten hapetusta, viitaten lisääntyneeseen elektroni transportaatioon mitokondrion hengitysketjussa (Alshawhi *et al.* 2019).

4.3 Metformiinin ja kuparin vuorovaikutus

Metformiinilla on huomattu olevan sitova vuorovaikutus mitokondrionaalisia kupari-ioneja kohtaan. Käytettäessä trietyleenitetramiinia ($C_6H_{18}N_4$, jatkossa trien), solun kuparikonsentraatiota voidaan vähentää eliminoimalla solun ulkopuolista kuparia. Logie *et al.* 2012 testasi kuparin vaikutusta metformiinin toimintaan. Kokeessa hyödynnettiin H4IIE-hepatoomasoluja, jotka käsiteltiin trienillä ylimääräisen kuparin eliminoimiseksi. Trien käsittely johti ainakin 50 % AMPK:n inhibitioon, jota metformiini stimuloi. Lisäksi metformiinin vaikuttaessa kuparin kanssa, yksi kupariatomi pystyy sitomaan kaksi metformiinimolekyyliä pseudoaromaattiseksi yhdisteeksi, joka kykenee aktivoimaan AMPK:ta (Logie *et al.* 2012).

Samassa tutkimuksessa selvitettiin, kuinka kupari vaikuttaa esimerkiksi mitokondrioissa. hyödyntämällä merosyaniini -merkkiaine 1:stä (DPD), joka reagoi fluoresenssiin, kun kupari ei pääse sitoutumaan siihen. Metformiinilla sekä toisella antidiabeettisella lääkkeellä pioglitazonella havaittiin kuparia inhiboivaa vaikutusta. Kyseisillä lääkeaineilla käsitellyissä H4IIE-hepatoomasoluissa ilmenee DPD-fluoresenssia (Kuva 2). Ilmiö toimii myös vain aineilla, joilta löytyy pseudoaromaattista luonnetta kuparikompleksin muodostuessa, joka johtuu π -elektronien delokalisoitumisesta kuparin vuorovaikutuksesta (Logie *et al.* 2012)



Kuva 2 – Metformiinilla (2mM) käsiteltyjä H4IIE soluja, joista näkyy fluoresenssiin reagoiva DPD-merkkiaine (vihreällä), solujen tumat (sinisellä) sekä merkityt mitokondriot (punaisella). Oik. alareunassa havainnollistava kuva metformiinin ja kuparin muodostamasta pseudoaromaattisesta kompleksista. Kuvat lähteestä (Logie et al. 2012).

Tulokset viittaavat vahvasti siis siihen, että metformiini kykenee vuorovaikuttamaan mitokondrionaalisen kuparin kanssa. Müller *et al.* 2018 vahvistaa tätä tutkimuksessa, jossa metformiinin huomattiin vaikuttavan mitokondrionaalisten Cu^{2+} ja Fe^{2+} -ionien pitoisuuksiin mesenkymaalisissa syöpäsoluissa. Tämä puolestaan vaikuttaa vahvistavan käsitystä siitä, että metformiinin vaikutus elektroninsiirtoketjuun johtaa AMPK-signaaloinnin kautta taphtuviin metformiinin vaikutuksiin. Pitää kuitenkin huomioida, että syöpäsoluissa metformiini näyttää vaikuttavan herkemmin mesenkymaalisessa vaiheessa, mikä eroaa verrattaessa tavallisiin soluihin (Müller *et al.* 2018).

4.4 Glukoosi-6-fosfataasi ja mitokondrionaalinen glyseroli-3-fosfaattidehydrogenaasi

G6PT:n tärkein tehtävä glukoneogeneesissä on hydroloidaa glukoosi-6-fosfaattia vereen eritettäväksi glukoosiksi ja vapaiksi fosfaateiksi. *G6pc*-geeni koodaa kyseistä entsyymiä, joka vaatii puolestaan hiilihydraattireaktioon vastaavan elementtiliittäjäproteiinin (ChREBP) toimimaan transkriptiotekijänä. ChREBP voi aktivoitua useammalla eri tavalla. Esimerkiksi fosforyloitujen glukoosi aineenvaihdunnan välituotteiden kuten fruktoosi 2,6-bifosfaatin (F2,6-BF) on huomattu inhiboivat ChREBP:n liittymistä *G6pc*-geenin promoottoriin. Muita vaikuttavia tekijöitä olivat kohonnut plasman glukoosi ja glukoosi-6-fosfaatti (G6P) (Arden *et al.* 2012).

Tabassum *et al.* 2020 esittää yhdeksi metformiinin vaikutusmekanismiksi hepatosyyteissä ChREBP:n ja G6PT:n inhibointia laskemalla solun G6P sekä F2,6-BF konsentraatioita. Tutkimuksessa hiiren ja rottien hepatosyyttejä käsiteltiin vaihtelevalla määrällä glukoosia, dihydroksiasetonia tai xylitolia. Osaa soluista käsiteltiin myös G6P-transportteria inhiboivalla klorogeenisellä happojohdannaisella S4048 ja metforminilla. Isoissa glukoosipitoisuuksissa S4048 lisäsi G6P:n määrää, kun taas metformiini laski G6P:n konsentraatiota vastaavissa koeolosuhteissa. Merkittävää muutosta solun kokonais-ATP:n pitoisuudesta ei tapahtunut (Moonira *et al.* 2020).

Glyseroli-3-fosfaattidehydrogenaasi (mGPDH) on mitokondrionaalinen entsyymi, joka katalysoi glyseroli-3-fosfaattia (G3P) dihydroksiasetonifosfaatiksi (DHAP). Entsyymi on tärkeä lipidimetaboliassa ja se on osana mitokondrion elektroninsiirtoketjun toimintaa. Se voi esiintyä myös vapaana solulimassa, jossa se katalysoi käänteistä reaktiota DHAP:sta G3P:ksi, hapettamalla NADH:ta NAD+:ksi. Tällä on suoraa vaikutusta solun energiametaboliaan (Mráček *et al.* 2013, Harding *et al.* 1975).

Gpd2-geeni koodaa mGPDH:ta, ja aikaisemmin mainittu ChREBP voi toimia myös kyseistä geeniä kohtaan. Kun *Gpd2*:n ekspressiota kohonneissa G3P ja G6P pitoisuuksissa selvitettiin, havaittiin, että myös ChREBP aktivoituu kyseisten molekyylien suurissa konsentraatioissa. Metformiinin vaikutus on kuitenkin päinvastainen ja se hillitsee *Gpd2*:n sekä *G6pc*:n ekspressoitua. Tämä todistaa madalletun G3P:n ja G6P:n pitoisuuksien olennaisuuden metformiinin toiminnassa (Moonira *et al.* 2020).

Mikä havainnosta tekee mielenkiintoisen, on se, että reaktioreitti ei näytä olevan AMPK-riippuvainen, vaikka aiemmin on esitetty, että AMPK on tärkeä osa metformiinin toimintaa. Esimerkiksi Foretz *et al.* (2010) on osoittanut, että metformiini inhiboi hepatosyyttien

glukoneogeneesiä hiirillä, joilta puuttuu LKB1/AMPK reaktioreitti kokonaan. Eli on hyvin mahdollista, että metformiinilla on toinenkin vaikutusreitti, joka ei ole suoraan AMPK:sta riippuva, vaan enemmänkin G6P:stä ja G3P:stä (Foretz *et al.* 2010).

Lisäksi metformiinin G6P:n alentamisen estäminen glukokinaasi-inhibiittorilla näyttäisi viittaavan siihen, että metformiinin ja G6P:n vuorovaikutus olisi merkittävä tyypin 2 diabeteksen terapeuttisessa vaikutuksessa. Metformiinin suora vaikutus glukoosin fosforylointiin sekä glykokeenin synteesiin näyttää olevan heikko, koska G6P:n alentaminen hidastaa näitä prosesseja (Moonira *et al.* 2020).

4.5 GCN5 ja SIRT1

Histoniasetyylitransferaasi (GCN5 tai KAT2A) on 93,94 kDa:n kokoinen transkriptiotekijänä toimiva entsyymi, jolla on glukoneogeneesiä inhiboivia ominaisuuksia (Uniprot 2020). NAD-riippuvainen proteiindeasetylaasisitruini-1 (SIRT1) on puolestaan 81,69 kDa:n kokoinen myös transkriptiotekijänä toimiva entsyymi, jonka säätelyn alaisuudessa ovat mm. TORC2-signalointireitti solun tumassa ja mitokondriossa (Uniprot 2020).

Caton *et al.* (2010) havaitsi, että kummallakin edellä mainitulla proteiinilla on taipumusta joutua metformiinin stimuloimaksi, jolla on heikentävää vaikutusta glukoneogeneesissa. Jo aikaisemmin esitelty TORC2-koaktivaattori muodostaa transkriptiofaktoreiden CREB ja BBP:n kanssa PGC1- α :aa ekspressoivan transkriptiokompleksin. PGC1- α on puolestaan tärkeä koaktivaattori fosfoenolipyruvaattikinaasia (PEPCK) koodaavalle *Pck1*-geenille. PGC1- α vaatii toimiakseen myös kaksi transkriptiotekijää FOXO1:n ja hepaattisennukleinitekijä-4- α :n (Hnf4 α) (Caton *et al.* 2010).

Kohonnut PEPCK konsentraatio maksasoluissa usein liittyy tyypin 2 diabetekseen, insuliiniresistenssiin sekä hyperglykemiaan. PEPCK:n liikaekspressointi voi aiheuttaa fysiologisia muutoksia soluissa, ja altistaa edellä mainituille sairauksille tai niitä vastaavalle fysiologiselle tilalle myös terveillä yksilöillä (Sun *et al.* 2002, Valera *et al.* 1994).

Palaten Caton *et al.* (2010) havaintoihin, tutkimuksessa selvitettiin metformiinin vaikutusta hiirten HEPG2-soluissa ja miten se liittyy TORC2-kompleksin, PGC1- α :n sekä PEPCK:n toimintaan ja pitoisuuksiin. Havainnot perustuvat kunkin tekijän l-RNA:n mittaamiseen, konsentraatioon, aktiivisuuteen sekä solun NADH/NAD⁺ arvoihin (Caton *et al.* 2010).

Tuloksissa metformiinilla käsitelty hiirisolut ekspressoivat SIRT1:stä enemmän ja solutason NAD⁺/NADH konsentraatiot olivat merkittävästi suuremmat verrattuna kontrolleihin. Korkean SIRT:n huomattiin myös laskevan glukoosi- ja insuliinipitoisuutta plasmassa. Metformiinilla oli myös heikentävää vaikutusta *Pck1*:n geeniekspressioon, koska se laski TORC2-kompleksin pitoisuuksia, minkä arvellaan olevan avainasemassa sen roolissa vähentää solun glukoneogeneesiä (Caton *et al.* 2010).

Tästä huolimatta, SIRT1:llä on havaittu myös päinvastainen glukoneogeneesiä stimuloiva vaikutus PGC1- α :n kautta, joka on riippumaton TORC2-reaktioreitistä. SIRT1 vuorovaikuttaa deasetyloimalla PGC1- α :n, mikä johtaa *Pck1*:n ekspressointiin (Rodgers *et al.* 2005).

GCN5 voi kuitenkin kilpailevasti inhiboida tätä SIRT:n stimuloivaa vaikutusta PGC1- α kohtaan. Diabeettisillä hiirillä oli varsin vähän GCN5:a ja sen l-RNA:ta havaittavissa. Kuitenkin metformiinin käyttö palautti GCN5:n määrän terveitä kontrolleja vastaaviksi. Pelkkien HEPG2-solujen inkuboiminen metformiiniliuoksessa kasvatti myös GCN5:n pitoisuuksia. On mahdollista, että GCN5:n lisääminen metformiinin vaikutuksesta, on yksi lääkeaineen useammista vaikutuskeinoista vastustaa ravintoaineiden tai hormonien stimuloimaa glukoneogeneesiä (Caton *et al.* 2010).

4.6 Glukagoni

Glukagoni on pieni 180 aminohapon mittainen peptidihormoni, joka painaa 5,85 kDa. (Uniprot 2020) Se toimii insuliinin vastavaikuttajana, ja sitä erittyy haiman Langerhansin saarekkeitten α -soluista. Glukagonin merkittävin vaikutus on glykogenolyysin ja glukoneogeneesin säätely. Glukagonin vaikutusmekanismi perustuu proteiinikinaasi A:n (PKA) aktivoimiseen, joka johtaa maksan varastosokerin eli glykokeenin hajottamiseen glukoosi-1-fosfaatiksi, joka on yksi tärkein elimistön sokeriaineenvaihdunnan välimolekyyli (Scott & Bloom 2018).

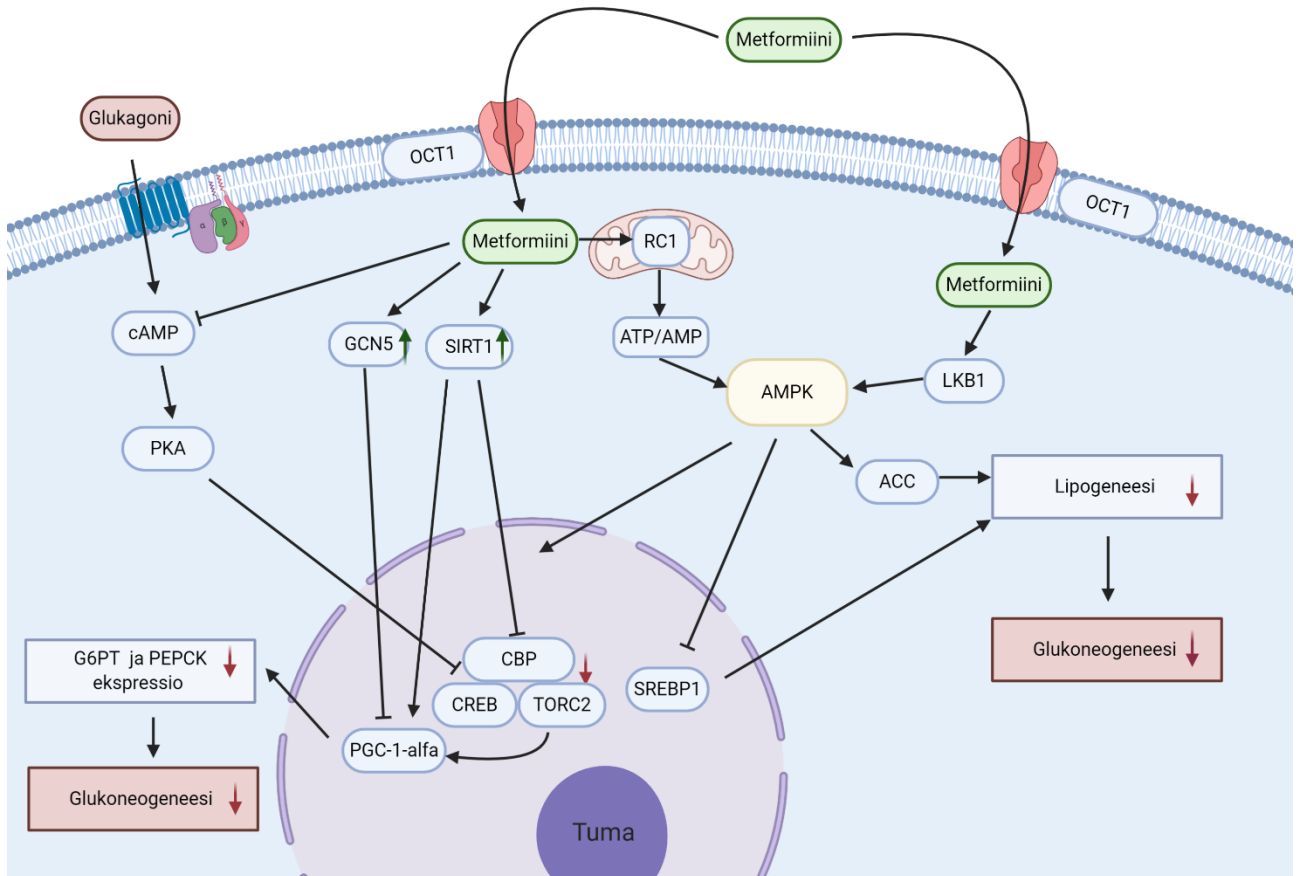
Glukagonin vaikutus alkaa sen liittyessä G-proteiinivälitteiseen reseptoriin (GPCR), jonka kolme alayksikköä α , β ja γ toimivat signaalinvälittäjinä solukalvon sisäpuolella. Prosessissa glukagonin liittyessä reseptoriin, α -alaysikkö hydrolysoi GTP:n GDP:ksi, joka saa alaysiköt irtoamaan reseptorista ja liikkumaan kalvolla kohti toista transmembraaniproteiinia, joka on adenyylaatti syklaasi (AC). AC valmistaa ATP:sta cAMP:tä, joka siirtyy solulimassa aktivoimaan proteiinikinaasi A (PKA) molekyylejä (Scott & Bloom 2018). PKA aktivoi fosforylaasikinaasin, joka fosforyloi glykokeenifosforylaasi B:n, joka vastaa glykokeeniketjun hajottamisesta glukoosi-1-fosfaateiksi. Nämä puolestaan osallistuvat solun glukoosiaineenvaihduntaan eri tavoilla (Scott & Bloom 2018).

Metformiinin on raportoitu laskevan solun sisäistä cAMP:tä, mikä vuorostaan vähentää PKA:n toimintaa ja roolia glukoneogeneesissä. Molemmat biguanidi-molekyylit metformiini ja fenformiini antoivat samankaltaisia tuloksia vuorokauden mittaisessa glukagonin inhiboimisessa, joka on yhteydessä solujen cAMP:n pitoisuuden vähenemiseen. Vastaavasti cAMP:n laskiessa tavallisen AMP:n konsentraatiot lisääntyvät, koska biguanidien inhibitiio estä AMP:n muuttumisen cAMP:ksi (Miller *et al.* 2013). Koska biguanidien vuorovaikutus glukagonin ja cAMP:n kanssa näytti merkittävältä, Miller esitti hypoteesin, että inhibition tulisi toimia ainoastaan endogeeniselle cAMP:lle mutta ei membraania läpäisevälle cAMP analogille (SP-8br-cAMPS-AM). Glukagonin PKA:n fosforylaatio indusoi kohdeproteiinien PFKFB1, CREB ja IP3R:n fosforylaatiota. Fenformiini ja metformiini kuitenkin aktivoivat hepatosyyttistä AMPK:ta ja estivät PKA:n kohdeproteiinien fosforylointia. cAMP-analogi ei joutunut puolestaan biguanidien antagonisoimaksi, mistä voidaan päätellä, että biguanidit kohdistavat inhibition glukagonin vaikutukseen. Näitten havaintojen lisäksi glukagonin ja cAMP-analogin huomattiin yhdessä lisäävän hepatosyytin glukoneogeneesiä, kun taas metformiini laski glukoneogeneesiä glukagonilla, mutta ei cAMP-analogilla. Myöskään valmiiksi inhiboitu PKA ei näyttänyt muutoksia glukoneogeneesissä metformiinikäsittelyjen jälkeen, mikä viittasi siihen, että metformiini poistaisi glukagonista johtuvaa cAMP:n kasvua, inhiboi PKA:ta ja estää tämän tuotteiden fosforylaatiota in vivo -olosuhteissa (Miller *et al.* 2013).

5. Yhteenveto

Metformiinilla on monia erilaisia vaikutusmekanismeja ja sillä on laaja vaikutus lukuisiin proteiineihin ja solusignaalintireitteihin. Se kykenee sekä aktivoimaan, että inhiboimaan aineenvaihdunnan prosesseja ja se on lääkeaineena tehokas vähäisten haittavaikutustensa ansiosta. Edellä käsiteltyjen esimerkkien perusteella, on hyvä todeta, että metformiinille ei löydy vain yhtä ainoaa ensisijaista vaikutusmekanismia, eikä tämä opinnäyte käsitellyt läheskään kaikkia mahdollisuuksia, mutta mainitut reaktioreitit ja vaikutusmekanismit on kuvattu yhteen (Kuva 3).

Diabeteksen lisäksi metformiinia on viime aikoina tutkittu hyvin monen muun eri sairauden yhteydessä, kuten sydän- ja verisuonitautien, polykystaisten munasarjojen sekä syövän hoidossa ja jopa aseena ikääntymistä vastaan. (Zhou *et al.* 2018) Näin monipuoliselle lääkeaineelle on todennäköisesti vielä tiedossa paljon tutkimusta, ja moninaisia teoriiota, läpimurtoja ja uusia vaikutusmekanismeja löydetään tulevaisuudella varsin todennäköisesti.



Kuva 3. Yleisesti koottu havaintokuva tutkielmassa käsitellyistä metformiinin vaikutusmekanismeista. Mustat nuolet kuvaavat aktivoivia reaktioreittejä, ja viivapäiset nuolet puolestaan reaktioreitin inhibitiota. Värilliset nuolet (vihr. ja pun.) kuvaavat tietyn reaktion tai molekyylin lisäämistä tai vähentämistä. Piirretty Biorender©-ohjelmalla (Bence Berki 2020).

6. Kirjallisuusviitteet

Alshawi A, Agius L. Low metformin causes a more oxidized mitochondrial NADH/NAD redox state in hepatocytes and inhibits gluconeogenesis by a redox-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2019;294:2839-2853

Arden C, Tudhope SJ, Petrie JL, Al-Oanzi ZH, Cullen KS, Lange AJ, Towle HC, Agius L. Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem J.* 2012 Apr 1;443(1):111-23. doi: 10.1042/BJ20111280. PMID: 22214556.

Bailey, C.J. (2017), "Metformin: historical overview." *Diabetologia* 60, sivut 1566–1576 (2017). Saatavilla: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-017-4318-z#citeas>

Bailey CJ & Day C (2004): "Metformin: its botanical background, short report", *Pract. Diab. Int.* April 2004 Vol. 21 No. 3. Saatavilla: <https://doi.org/10.1002/pdi.606>

Bosisio E, Kienle MG, Galli G et al (1981) Defective hydroxylation of phenformin as a determinant of drug toxicity. *Diabetes* 30:644–649

Cameron AR, Logie L, Patel K, Erhardt S, Bacon S, Middleton P, Harthill J, Forteath C, Coats JT, Kerr C, Curry H, Stewart D, Sakamoto K, Repiščák P, Paterson MJ, Hassinen I, McDougall G, Rena G. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biol.* 2018 Apr;14:187-197. doi: 10.1016/j.redox.2017.08.018. Epub 2017 Aug 26. PMID: 28942196; PMCID: PMC5609876.

Carling D, Sanders MJ, Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond).* 2008;32 Suppl 4:S55-S59. doi:10.1038/ijo.2008.124

Caton PW, Nayuni NK, Kieswich J, Khan NQ, Yaqoob MM, Corder R. (2010) "Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5", *J Endocrinol.* 2010 Apr;205(1):97-106. doi: 10.1677/JOE-09-0345. Epub 2010 Jan 21. PMID: 20093281

Colagiuri Stephen, Aschner P, Beck-Nielsen H, Bennett P, Boulton A, Colagiuri R, Franz M, Gadsby R, Gagliardino JJ, Home P, McGill M, Manley S, Marshall S, Mbanya JC, Neil A, Ramachandran A, Ramaiya K, Roglic G, Schaper N, Siminerio L, Sinclair A, Snoek F, Van Crombrugge P, Vespasiani G, Viswanathan V, Sim K (2012) "Global Guideline for Type 2 Diabetes", International Diabetes federation, 166 Chaussee de La Hulpe, B-1170, Brussels, Belgium. ISBN 2-930229-43-8 Saatavilla: www.idf.org

Culpeper N (1995) *Culpeper's complete herbal: a book of natural remedies for ancient ills.* Wordsworth Editions Ltd, Ware, Hertfordshire p335. [Viitattu 5.6.2020] Saatavissa: https://books.google.co.uk/books?id=aGih_JZtPvoC&pg=PA335&lpg=PA335&dq=galega+culpeper+herbal&source=bl&ots=77gExCABA_&sig=wV0BcjUm_RS8F6ZRMjo8N8F6zgU&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiPw_fj6YzSAhUBJcAKHV4EB2kQ6AEIQTAA#v=onepage&q=galega%20culpeper%20herbal&f=true

Curd FHS, Davey DG, Rose FL (1945) "Studies on synthetic antimalarial drugs. Some biguanide derivatives as new types of antimalarial substances with both therapeutic and causal prophylactic activity." *Ann Trop Med Parasitol* 39:208–216

Drugbank. Metformin. [Verkkodokumentti] Drugbank – verkkosivut. Päivitetty 3.6.2020 klo 8.33. [Viitattu 12.6.2020]
Saatavilla: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>

Duodecim käypä hoito. Diabetes [Verkkodokumentti] Duodecim käypä hoidon verkkosivut 26.3.2018. [Viitattu 5.6.2020] Saatavissa: <https://www.kaypahoito.fi/kht00063>

El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* (2000) 275:223–8. 10.1074/jbc.275.1.223

Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2355–2369.
doi:10.1172/JCI40671

Garcia E. 1949 flumamine. untraced publication from the Philippines. cited by Sterne J in an interview [April 4, 1996] for Merck-Lipha published in *Glucophage*. In: Pasik C, editor. *Serving Diabetology for 40 Years*. Lyon: GroupeLipha; 1997:21, 29.

Graham, G.G., Punt, J., Arora, M. et al. (2011) "Clinical Pharmacokinetics of Metformin", *Clin Pharmacokinet* 50, 81–98 (2011). Saatavilla: <https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000>

Güthner T, Bernd Mertschenk B and Schulz B (2006), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006, p. 175–189.

Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem.* 1997 Jun 1;246(2):259–73. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x. PMID: 9208914.

Harding JW Jr, Pyeritz EA, Copeland ES, White HB 3rd. Role of glycerol 3-phosphate dehydrogenase in glyceride metabolism. Effect of diet on enzyme activities in chicken liver. *Biochem J.* 1975 Jan;146(1):223–9. doi: 10.1042/bj1460223. PMID: 167714; PMCID: PMC1165291.

Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The anti-diabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 2002;51:2420–2425.

Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes.* 1998 Aug;47(8):1369–73. doi: 10.2337/diab.47.8.1369. PMID: 9703344.

He L, Wondisford FE (2015), "Metformin Action: Concentrations Matter", *Cell metabolism*, Volume 21, issue 2, P159–162, Feb. 03, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.003>

Ilanne-Parikka Pirjo, Diabetes ("sokeritauti"). [Verkkodokumentti] Duodecim Lääkärikirja, Duodecim terveyskirjasto 5.2.2018. [Viitattu 5.6.2020] Saatavissa:

https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00011#s5

Lindström Jaana, Jousilahti Pekka, Laatikainen Tiina, Jula Antti ja Markku Peltonen. Diabetes. [Verkkodokumentti] Terveys, toimintakyky ja hyvinvointi Suomessa, Finterveys 2017 –tutkimus, THL raportti 4/2018. [Viitattu 5.6.2020] Saatavilla: <http://www.julkari.fi/handle/10024/136223>

Logie, L., Harthill, J., Patel, K., Bacon, S., Hamilton, D. L., Macrae, K., McDougall, G., Wang, H. H., Xue, L., Jiang, H., Sakamoto, K., Prescott, A. R., & Rena, G. (2012). Cellular responses to the metal-binding properties of metformin. *Diabetes*, 61(6), 1423–1433. <https://doi.org/10.2337/db11-0961>

Luft D, Schmulling RM, Eggstein M (1978) Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics. *Diabetologia* 14:75–87

Miller, R., Chu, Q., Xie, J. et al. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 494, 256–260 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature11808>

Moonira, T., Chachra, S. S., Ford, B. E., Marin, S., Alshawi, A., Adam-Primus, N. S., Arden, C., Al-Oanzi, Z. H., Foretz, M., Violette, B., Cascante, M., & Agius, L. (2020). Metformin lowers glucose 6-phosphate in hepatocytes by activation of glycolysis downstream of glucose phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 295(10), 3330–3346. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012533>

Mráček T, Drahota Z, Houštěk J. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar;1827(3):401-10. doi: 10.1016/j.bbabo.2012.11.014. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23220394.

Müller, S., Versini, A., Sindikubwabo, F., Belthier, G., Niyomchon, S., Pannequin, J., Grimaud, L., Cañeque, T., & Rodriguez, R. (2018). Metformin reveals a mitochondrial copper addiction of mesenchymal cancer cells. *PloS one*, 13(11), e0206764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206764>

Natras M, Alberti KGMM. Biguanides. *Diabetologia* 1978; 14: 71–74.

Owen, M. R., Doran, E., & Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*, 348 Pt 3(Pt 3), 607–614.

Owen, M. R., & Halestrap, A. P. (1993). The mechanisms by which mild respiratory chain inhibitors inhibit hepatic gluconeogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1142(1-2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90079-u](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90079-u)

Pasik C (1997) Diabetes and the biguanides: the mystery of each. In: Pasik C (ed) *Glucophage: serving diabetology for 40 years*. Groupe Lipha, Lyon, p79

Pharma Fennica, METFOREM depottabletti 500 mg, 750 mg. [Verkkodokumentti] Pharma Fennican verkkosivut. Päivitetty 11.11.2016. [Viitattu 15.6.2020] Saatavissa: <https://pharmacafennica.fi/spc/2971571>

- Pubchem. Guanidiini. [Verkkodokumentti] Pubchem – verkkosivut. Päivitetty 27.6.2020. [Viitattu 9.6.2020] Saatavilla: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guanidine>
- Pubchem. Metformin. [Verkkodokumentti] Pubchem – verkkosivut. Päivitetty 27.6.2020. [Viitattu 9.6.2020] Saatavilla: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin>
- Rea PA, Pauly MV, Burns LR. (2018). "Managing Discovery in the life Sciences: Harnessing creativity to drive biomedical innovation". Cambridge University Press (February 1, 2018), ISBN-13: 978-1107577305 page. 282- 283. Saatavilla: https://books.google.fi/books?id=erZDDwAAQBAJ&pg=PA269&lpg=PA269&dq=Slotta+%26+Tschesche+1929+metformin&source=bl&ots=jGtfUJyo3K&sig=ACfU3U0FGwoy7YtyPqulPrODdYzhSywHeQ&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwjCjO3x47HqAhXQepoKHSg_BSkQ6AEwAHOECAgQAQ#v=onepage&q=Slotta%20%26%20Tschesche%20&f=false
- Reiter, Allan J ; Horner, William H (1978): "Studies on the metabolism of guanidine compounds in mammals: Formation of guanidine and hydroxyguanidine in the rat", Archives of Biochemistry and Biophysics 1979, Vol.197(1), pp.126-131
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER. "The mechanisms of action of metformin." Diabetologia. 2017 Sep;60(9):1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28776086; PMCID: PMC5552828.
- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. Nature, 434(7029), 113–118. <https://doi.org/10.1038/nature03354>
- Scott, R. V., & Bloom, S. R. (2018). Problem or solution: The strange story of glucagon. Peptides, 100, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.013>
- Shah RR, Oates NS, Idle JR, Smith RL (1980) Genetic impairment of phenformin metabolism. Lancet 315:1147
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science. 2005;310(5754):1642-1646. doi:10.1126/science.1120781
- Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. J Clin Invest. 2007 May;117(5):1422-31. doi: 10.1172/JCI30558. PMID: 17476361; PMCID: PMC1857259.
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. J Biol Chem. 1996 Jan 12;271(2):611-4. doi: 10.1074/jbc.271.2.611. PMID: 8557660.
- Sun, Y., Liu, S., Ferguson, S., Wang, L., Klepcyk, P., Yun, J. S., & Friedman, J. E. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. The Journal of biological chemistry, 277(26), 23301–23307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200964200>
- Tanihara Y, Masuda S, Sato T, et al. (2007) "Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters" Biochem Pharmacol 2007; 74: 359-71

Terveiden ja hyvinvoinnin laitos. Diabetes. [Verkkodokumentti] Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen verkkosivut. Päivitetty 1.6.2020. [Viitattu 5.6.2020] Saatavissa: <https://thl.fi/fi/web/kansantaudit/diabetes>

Tien, A., & Rea, P. (2018). Metformin: To the Brink and Back. In P. Rea, M. Pauly, & L. Burns (Authors), *Managing Discovery in the Life Sciences: Harnessing Creativity to Drive Biomedical Innovation* (pp. 262-300). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781316459263.011

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352:854–865

Ungar G, Freedman L, Shapiro SL. Pharmacological studies of a new oral hypoglycaemic drug. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 100: 190–192.

Uniprot. Q92830 (KAT2A_HUMAN) [Verkkodokumentti] Uniprot - verkkosivut. Päivitetty 17.6.2020. [Viitattu 26.6.2020] Saatavilla: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q92830>

Uniprot. Q96EB6 (SIR1_HUMAN) [Verkkodokumentti] Uniprot - verkkosivut. Päivitetty 17.6.2020. [Viitattu 26.6.2020] Saatavilla: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q96EB6>

Valera, A., Pujol, A., Pelegrin, M., & Bosch, F. (1994). Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 9151–9154. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.9151>

WATANABE C. K. (1918), STUDIES IN THE METABOLIC CHANGES INDUCED BY THE ADMINISTRATION OF GUANIDINE BASES: VI. The Influence of Guanidine Acidosis on the Fat Content of the Blood, *The Journal of Biochemistry*, Volume 1, Issue 2, April 1922, Pages 195–200.

Werner EA, Bell J (1922) "The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyandiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively." *J Chem Soc Trans* 121:1790–1794

WHO. Diabetes. [Verkkodokumentti] WHO:n verkkosivut 8.6.2020. [Viitattu 9.6.2020] Saatavissa: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1167-74. doi: 10.1172/JCI13505. PMID: 11602624; PMCID: PMC209533.

Zhou, J., Massey, S., Story, D., & Li, L. (2018). Metformin: An Old Drug with New Applications. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2863. <https://doi.org/10.3390/ijms19102863>

Zhou M, Xia L, Wang J. (2007) "Metformin transport by a newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine." *Drug Metab Dispos*. 2007;35(10):1956-1962. doi:10.1124/dmd.107.015495